

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

**MEHANIZMI REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE U
RODA *PSEUDOMONAS***

**ANTIBIOTIC RESISTANCE MECHANISMS IN
PSEUDOMONAS GENERA**

SEMINARSKI RAD

**Dean Karaica
Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)
Mentor: Dr. sc. Jasna Hrenović, docent**

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. OSNOVNE ZNAČAJKE BAKTERIJE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>.....	3
3. UVOD U MEHANIZME REZISTENCIJE.....	4
4. MULTIPLA REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE U VRSTE <i>P. AERUGINOSA</i> – OTKRIĆE MEXAB-OPRM OPERONA.....	5
4.1 ULOGA EKSPORTNOG OPERONSKG SUSTAVA	5
4.2 SOJEVI I METODE KORIŠTENI ZA OTKRIVANJE FUNKCIJE ORFABC	6
4.3 PODLOŽNOST SOJA K385 NA ANTIMIKROBIALNE AGENSE.....	8
3.4 PROVEĆANA PRODUKCIJA PROTEINA CITOPLAZMATSKJE MEMBRANE.....	9
4.5 NUKLEOTIDNA SEKVENCA ORFC GENA	10
4.6 KARAKTERIZACIJA MUTANATA S DEFETOM U ORFABC OPERONU.....	12
4.7 HOMOLOGIJA PRODUKATA ORFABC OPERONA S BAKTERIJSKIM PROTEINIMA UKLJUČENIM U OTPORNOST NA ANTIMIKROBIOTČKE AGENSE.....	13
4.8 HOMOLOGIJA ORFABC PRODUKATA I BAKTERIJSKIH EKSPORTNIH PROTEINA.....	14
4.9 KRATKA DISKUSIJA OTKRIĆA ORFABC OPERONA.....	15
4.10 PROTEIN VANJSKE MEMBRANE (OPRM) PESUDOMONAS AERUGIONSA KODIRAN OPRK KOMONENTOM MEXA-MEXB-OPRK OPERONA	17
5. MEXCD-OPRJ OPERON.....	18
6. MEXEF-OPRN OPERON.....	19
7. MEXXY-OPRM OPERON	20
8. ZAKLJUČAK.....	21
9. SAŽETAK.....	22
10. SUMMARY.....	22
11. LITERATURA.....	23

1. Uvod

Možemo reći da danas živimo u eri antibiotika. Njihova upotreba u borbi protiv raznih bakterijskih infekcija dosada je bila nezamjenjiva. Danas, ta nezamjenjivost dolazi u pitanje zbog pojave razvitka otpornosti pojedinih bakterijskih vrsta. Tema rezistencije bakterija vrlo je zanimljiva, jer uključuje utjecaj mnogo faktora, pa sam se baš iz tog razloga odlučio pozabaviti ovim pitanjem u narednom tekstu. Pa, kako obuhvatiti tu temu, a da nešto ne izostane? Ovo pitanje mučilo me kroz cijeli proces sastavljanja ovog seminara, ali mislim da sam našao dobitnu kombinaciju. Naime, odlučio sam napraviti koncept za koji mislim da će dati dobar uvid u faktore odgovorne za razvoj rezistencije. Svaki dobar koncept uključuje i reprezentativan objekt proučavanja, a on je u ovom slučaju vrsta Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Svoju reprezentativnost potvrđuje činjenicom da je kod različitih sojeva ove vrste zamjećena pojava multiple rezistencije na antibiotike. Kako je ovo patogena vrsta bakterije koja izaziva infekcije kod čovjeka, provedena su istraživanja u cilju otkrivanja uzroka njezine višestruke otpornosti na antibiotike. Iz ranih istraživanja proizašle su hipoteze koje su se vremenom potvrđivale ili nadograđivale da bi danas znali za postojanje određenih mehanizama zaslužnih za navedeni fenotip pojedine bakterije. Zbog svog interesa odlučio sam se fokusirati na istraživanja koja su dovela do otkrića eksportnih proteina kodiranih specifičnim operonskim sustavima. Iako zvuči komplicirano, bit svega je da su navedeni eksport-proteini, zapravo, strukturni dijelovi pumpi koje preko stanične membrane izbacuju neželjene tvari izvan stanice. Tokom čitanja, nadam se da ćete usvojiti slijed razmišljanja koji je doveo do otkrića spomenutih operonskih sustava. No, prije svega moramo se bolje upoznati s našim predmetom proučavanja, bakterijom *P. aeruginosa*.

2. Osnovne značajke bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Rod *Pseudomonas* karakteriziraju Gram-negativni, nefermentativni, pokretni aerobni štapići od kojih neki stvaraju pigmente topljive u vodi. Najznačajnija vrsta ovog roda, zbog svoje invazivnosti i toksigenosti, je *P. aeruginosa*. Ona ponekad čini sastavni dio normalne mikroflore u ljudi gdje nema negativnih učinaka. Izvori infekcije i način prenošenja često su nejasni. Bakterija često kolonizira vlažna područja ljudskog organizma kao što su perineum, aksila i uho. Shodno tome vrlo je česta infekcija pluća u osoba koje boluju od cistične fibroze. Makromorfologija kolonija, unutar roda, razlikuje se ovisno o vrsti (mukoidne, naborane, patuljaste, ...). Najčešći su, ipak oblici kolonija ovoga opisa: spljoštene, nazubljenih rubova, sivo-zelenog metalnog sjaja, hrapave ili glatke površine te izdignute, glatke s oštrim rubovima, poput kolonija enterobakterijacea.

Skupina bakterija roda *Pseudomonas* pri pogodnim uvjetima u vodi ili kloroformu proizvodi fluorescentne i nefluorescentne pigmente koji difundiraju u agar. Ti pigmenti su piocijanin (plavi pigment kojeg stvara većina sojeva *P. aeruginosa*) i pioverdin ili fluorescein (žut, fluorescentan pigment kojeg stvara većina sojeva *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*). Ostali pigmenti koje proizvodi tek 5% sojeva *P. aeruginosa* pripadaju skupini hrđavo-crvene boje pod imenom piorubini. Zanimljivo je spomenuti da mnogi sojevi *P. aeruginosa* stvaraju hemolizin koji u potpunosti uništava eritrocite.

P. aeruginosa je, kao bakterija patogena za čovjeka, povezana s bolničkim infekcijama kod imunokompromitiranih individua. Najčešće su primjećene infekcije kao rezultat opeklina ili drugih ozbiljnijih trauma te kod bolesti kao što je rak, dijabetes i već spomenuta cistična fibroza. Unutarnja otpornost ove bakterije dugo je pripisivana samo svojstvima vanjske membrane (kao barijere smanjene propusnosti). No danas je poznato da iako reducirana propusnost doista limitira pristup ciljnim mjestima antimikrobnih tvari unutar stanice, ona je također velikim djelom poduprta dodatnim eksportnim mehanizmima. Danas je poznato da se ovaj tip unutarnje otpornosti temelji na sinergiji između relativne nepropusnosti vanjske membrane te genski kodiranih eksportnih sistema. Otkriveno je i opisano nekoliko takvih operonskih sustava (kod vrste *P. aeruginosa*) kao što su MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN i MexXY-OprM. Prepoznat je i određen broj

homolognih sistema u drugih gram-negativnih bakterija kod kojih imaju jednako važnu funkciju u prirodnoj i stečenoj rezistenciji na antimikrobialne tvari.

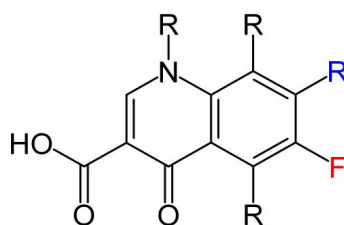
3. Uvod u mehanizme rezistencije

Pseudomonas aeruginosa je, kao što smo već spomenuli, patogena oportunistička bakterija koju karakterizira urođena multipla rezistencija na antimikrobialne agense. Veliki doprinos toj urođenoj osobini daje nekoliko sistema za izbacivanje tvari (ekspornih mehanizama) poput MexAB-OprM i MexXY-OprM. Navedenima možemo dodati još dva tripartitna eksportna sistema, MexCD-OprJ i MexEF-OprN, koji također promoviraju karakteristiku stečene multiple rezistencije na antibiotike (i to kao posljedicu mutacijom izazvane hiperekspresije eksportnih gena). Osim antibiotika ove pumpe vrše izbacivanje mnogih boja, detergenata, inhibitora i organskih otapala. Među ovim proteinskim pumpama možemo vidjeti velik stupanj homologije što možda ukazuje na sličnu prirodu funkcije ili postanka. Ako pogledamo njihovu strukturu (i funkciju), možemo uočiti kako su pumpe ugrubo sastavljene od dva dijela (tri proteina). Jedan je dio smješten na unutrašnjoj membrani (čine ga dva proteina) i ima funkciju citoplazmatskog antiportera, dok je drugi dio smješten na vanjskoj membrane (čine ga jedan protein) u obliku kanala. Citoplazmatski antiporter protein vrši transport protona unutar stanice, a ujedno i izbacivanje određenih tvari kao što su npr. antibiotici. Sisteme homologne ovima možemo naći kod drugih vrsta kao što su *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei* te kod napatogene vrste *Pseudomonas putida*. Kvantitativno gledano, ovi mehanizmi igraju važnu ulogu u eksportu antimikrobialnih tvari i organskih otapala. Unatoč tome što je izvorna (prirodna) funkcija ovih eksportnih sistema upitna, njihov doprinos razvitku otpornosti na antibiotike te njihova konzervacija kod mnogih patogena čini ih logičnim metama za proučavanje ovakve problematike.

4. Multipla rezistencija na antibiotike u vrste *P. aeruginosa* – otkriće MexAB-oprM operona

4.1 Uloga eksportnog operonskog sustava

Problem pojave rezistencije na različite agense, koji su dosada imali veliki antibakterijski utjecaj na spomenutu vrstu (rod) *P. aeruginosa*, postaje sve izraženiji. Naime, supstance kao što je porodica sintetičkih antibiotika širokog spektra pod nazivom quinoloni (češće floroquinoloni) gube svoj klinički značajan utjecaj.



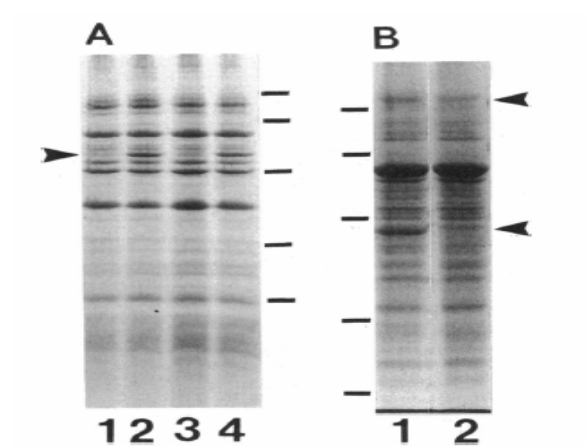
Osnovna struktura svih quinolona: R ostatak je najčešće piperazin; crveno označen fluor (preuzeto sa web stranice <http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolones>)

Uočeno je kako se “unakrsna” rezistencija na kemijski nepovezane antibiotike može u određenoj mjeri povezati s rezistencijom na floroquinolone. Provedena proučavanja sojeva s navedenim karakteristikama (u uvjetima in vitro) pokazala su kako su za takvu kombinaciju otpornosti, na neki način, zaslužni proteini stanične membrane. Naime, oni su zamjecceni kod spomenutih sojeva koji su imali smanjenu akumulaciju tvari s antibiotskim djelovanjem. Uočavanjem tih proteina došlo se do hipoteze kako bi promjena u permeabilnosti membrane mogla rezultirati spomenutim antimikrobiološkim svojstvima. Zanimljivo je istaknuti kako je “unakrsna” rezistencija na kemijski različite antibiotike svojstvo, koje možemo naći i kod mutanata vrste *Escherichia coli* (s rezistencijom na floroquinolone) (Poole i sur. 1993). Kod ove vrste bakterija je identificiran sustav aktivnog transporta (ovisan o energiji) kojemu se pridaju zasluge za izbacivanje tvari antibiotskog djelovanja. Spoznaja o takvom eksportnom sustavu prethodila je otkriću operon sustava ORFABC za koji će se utvrditi uloga u formaciji sličnog sustava. Znalo se da je ORFABC operon sustav navodno je ukljuccen u sekreciju pioverdina (spoja koji ima karakteristiku siderofornog proteina) izvan stanice. Pioverdin bakteriji omogućuje akviziciju

(pribavljanje) željeza iz okoline, a značajan je posebno u uvjetima kada je okoliš siromašan navednim elementom (Poole i sur. 1993). Zbog navedenih podataka formirala se pretpostavka kako modifikacija ovog operonskog sustava može potencijalno rezultirati otpornošću bakterija na uobičajene antibiotike. Tako se krenulo u istraživanje funkcije ORFABC operona.

4.2 Sojevi i metode korišteni za otkrivanje funkcije ORFABC

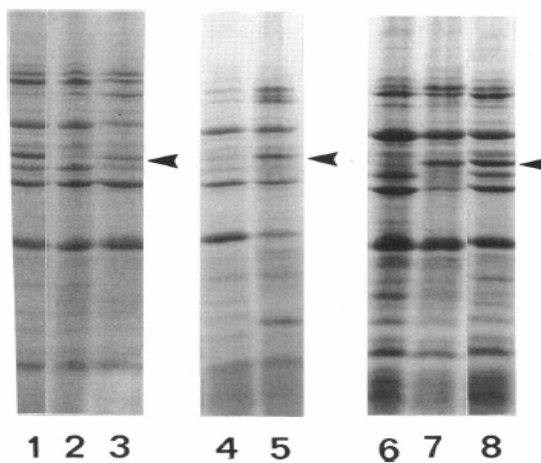
U pokušaju da se identificiraju komponente stanične membrane, uključene u pribavljanje željeza kod vrste *P. aeruginosa* korištene su spontane mutante soja K372. Kako one mogu rasti u prisutnosti nemetabolizirajućeg helatora koji inhibira rast vežući željezo iz prisutnog medija (2,2 -dipiridil, konc. 0.5 mM), bile su pogodne za istraživanje proteina zaslužnih za stanično pribavljanje željeza. Naime, mutante koje mogu rasti na prethodno opisanom mediju s visokom razinom restrikcije za željezo moraju imati unaprijeđeni, tj. drugačiji sustav nabavke željeza kako bi kompenzirale za navedene uvjete. Više je mutanata, sposobnih za rast na ovakvom mediju, izolirano te je kod mnogih (primjerice soj K385) uočena povećana razina “novog” proteina vanjske membrane. Molekulska masa ovog OprK proteina iznosila je 50-kDa (Slika 1., usporedi linije 1 i 2). Pokazalo se da produkcija OprK proteina kod soja K385 nije potisnuta željezom ni kod bitno veće koncentracije željeza (200 μ M FeSO₄; slika 1A linija 4). No, produkcija istog proteina nije bila inducirana u roditeljskom soju PAO1 (prirodno nema povećanu produkciju OprK) uzgajanom na mediju s niskom koncentracijom željeza (slika 1A, usporedi linije 1 i 3). Usprkos prethodom slučaju, produkcija proteina kod roditeljskog soja je ipak postignuta (inducirana) u minimalnom mediju s oskudnom koncentracijom željeza uz prisutnost HEPES pufera (Slika 2, linija 5). Izostanak produkcije OprK proteina kod prethodog slučaja bez HEPES pufera objašnjen je nedovoljno niskom razinom željeza u mediju.



Slika 1. A) Proteini vanjske membrane vrste *P. aeruginosa* soja K372 i soja K385
(OprK-naglašen strelicom)
B) Proteini citoplazmatske membrane sojeva K385 i K372 (redom)

Tablica 1. U tablici su podaci o uzgoju pojedinog soja (odgovaraju poretku na elektroforetskom gelu)

Medij\linije	1A	2A	3A	4A	1B	2B
Deficijentan željezom	K372	K385			K385	
Suficijentan željezom			K372	K385		K372



Slika 2. Indukcija produkcije OprK proteina kod vrste *P. aeruginosa* soja K372.
OprK je označen strelicama!

Tablica 2. Popis sojeva koji odgovara linijama prikazanim na slici 2.

Linije	
1 i 8	*Soj K385 uzgojen u mediju – Iron-deficient BM2 succinate minimal medium
2	Iron-deficient BM2 succinate minimal medium
3	Iron-deficient BM2 succinate minimal medium with dipyridyl (0.5 mM)
4	Iron-sufficient HEPES-buffered minimal medium
5	Iron-deficient HEPES-buffered minimal medium
6	Iron-deficient BM2 succinate minimal medium
7	Iron-deficient BM2 succinate minimal medium with ZnSO ₄ (0.1 mM)

* bandovi soja K385

Produljena inkubacija (24 do 36 sati) soja K372 u prisutstvu 0.5 mM 2,2-dipiridila rezultirala je rastom navedenog soja i pratećom indukcijom OprK proteina (Slika 2., linija 3). Zanimljivo je istaknuti kako je maksimalna produkcija proteina postignuta u prisutstvu cinkovog sulfata (Slika 2. linija 7). Indukcija OprK putem cinka (Zn²⁺) konzistentna je s regulacijom željeza ovog proteina. Ako znamo da cink pojačava ekspresiju gena za produkciju siderofora i njihovih receptora logično je pretpostaviti da to omogućuje smanjenje koncentracije slobodnog željeza te već spomenutu indukciju proizvodnje OprK proteina. Sličan efekt opažen je kod vrsta *Pseudomonas fluorescens* i *Azotobacter vinelandii* (Poole i sur. 1993).

4.3 Podložnost soja K385 na antimikrobialne agense

Produkcija 50-kDa proteina, lociranih na vanjskoj membrani, prvotno je opaženo kod mutanata *P. aeruginosa* otpornih na streptonigrin (K375). Osim njega, soj K385 je također pokazao izrazitu otpornost na tu tvar uz prateću sintezu navedenog proteina (pogledaj tablicu 3.) (Poole Keith i sur. 1993). Veza između produkcije određenog proteina i rezistencije na antimikrobialni agens zanimljiva je to više što je dosada opažen nezanemariv broj slučajeva gdje quinolon - rezistentni *P.aeruginosa* sojevi posjeduju proteine

s otprilike istom molekulskom masom (ca.50-kDa). Proteini ovih sojeva nalaze se na istoj lokaciji (vanjska membrane/opna) kao i OprK protein. Nadalje, ovi su mutanti pokazali dodatnu, tj. “unakrsnu” otpornost na nequinolonske antibiotike (Poole i sur. 1993).

Istraživanje osjetljivosti soja K385 otkrilo je spomenutu činjenicu o otpornosti na quinolonske (ciprofloksacin i nalidiksičnu kiselinu) kao i na nequinolonske antibiotike kloramfenikol i tetraciklin (pogledaj tablicu 3).

Tablica 3. Podložnost sojeva *P.aeruginosa* na odabrane antimikrobialne agense
(preuzeto iz rada Poole i sur. 1993.)

Susceptibilities of <i>P. aeruginosa</i> strains to selected antimicrobial agents						
Strain	MIC ^a of:					
	DIP	SN	CIP	NAL	CAM	TET
K372	0.5	10	0.125	62.5	12.5	2.5
K385	1.0	40	1.5	250	100	25

^a Values are reported in micrograms per milliliter, except that values for dipyrldyl are reported as micromolar concentrations. DIP, 2,2'-dipyridyl; SN, streptonigrin; CIP, ciprofloxacine; NAL, nalidixic acid; CAM, chloramphenicol; TET, tetracycline.

3.4 Provećana produkcija proteina citoplazmatske membrane

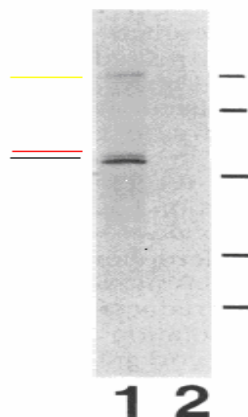
Kod prije spomenutih sojeva *E.coli* (koje karakterizira otpornost na quinolone i multipla rezistencija na antibiotike) svojstvo rezistencije dijelom je bilo pripisano komponenti za izbacivanje tvari s lokacijom na citoplazmatskoj membrani. Kako bi se odredilo da li je fenotip soja K385 određen promjenama u citoplazmatskoj membrani, a ne samo u povećanoj količini proteina vanjske membrane (OprK) priređene su frakcije citoplazmatske membrane soja K385 i njegovog roditeljskog soja. Frakcije su predočene i analizirane na SDS – poliakrilamidnom gelu. Protein molekulske mase ca. 40 kDa uočen je u pripravku soja K385, dok isti nije primjećen u roditeljskog soja K372 (pogledaj Sliku 1B. linija 1). Gledajući na gel možemo uočiti područje intenzivnog difuznog obojenja koje odgovara molekulskoj masi proteina ca. 108 kDa. Takav rezultat može biti posljedica povećane produkcije ovog proteina ili pak proizvodnje dodatnog proteina slične veličine. Daljnjim

proučavanjem uočeno je podudaranje molekulskih masa produkata novootkrivenog operonskog sustava kojeg sačinjavaju najmanje tri gena (ORFABC) i navedenih molekulskih masa proteina citoplazmatske membrane. Predloženo je da prva dva gena kodiraju za produkte 40 i 108 kDa, koje možemo locirati na citoplazmatskoj membrani, a zadnji gen bi tada kodirao za protein vanjske membrane (OprK). Mutanti koji su imali defekt u ORFAB genima pokazali su smanjenu sposobnost rasta u prisutstvu 2,2-dipiridila (supstance koja smanjuje konc. slobodnog željeza, vežući ga), što je indirektno dokazalo prvi dio hipoteze vezan za ORFAB gene. Kako bi se potvrdio i drugi dio ove hipoteze, koji kaže da je OprK protein kodiran ORFC genom, provedeno je sekvenciranje trećeg ORFC gena (Poole i sur. 1993).

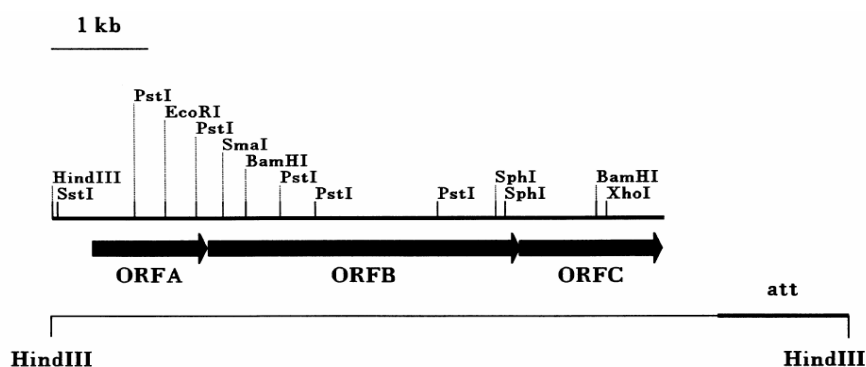
4.5 Nukleotidna sekvenca ORFC gena

Kako bi potvrdili da je OprK zapravo produkt ORFC gena obavljeno je njegovo sekvenciranje. Utvrđeno je kako je gen određen s 1430 parova baza što odgovara produktu od 476 aminokiselina. Takav produkt, kojeg sačinjava navedeni broj građevnih jedinica, imao bi molekulsku masu od 51,481 Da. Prethodno je predviđeno da bi konačni (zreli) polipeptid trebao biti sačinjen je od 460 aminokiselina te bi trebao imati masu od 50,010 Da. Ekspersijom ORFC gena na fragmentu SmaI-HindIII (veličine 6.5 kb) u vrste *E.coli* dobiveni su produkti molekulske mase od 49 kDa (u većoj količini) i 51 kDa (pogledaj sliku 3. i sliku 4.). Ovi rezultati su odgovarali predviđenim molekulskim masama konačnih (mol. masa OprK) i prekursorskih formi produkta ORFC gena, redom. Osim navedenih opažen je trag na gelu iznad molekularnog markera od 97 kDa koji očigledno odgovara ORFB genu, jer je on u velikoj mjeri zastupljen u fragmentu SmaI-HindIII. Unatoč nestabilnosti proteina u kiseloj sredini, prilikom njegovog tretiranja CNBr-om dobivena je dovoljna količina produkta od 43 kDa. Produkt je podvrgnut N-terminalnim sekvenciranjem aminokiselina, a dobivena sekvenca za ovaj degradacijski produkt odgovarala je predviđenoj sekvenci aminokiselina kodiranih ORFC genom s početkom na odsječku 73. ORFC derivirani produkt s početkom na spomenutom odsječku imao bi molekulsku masu od 44,110 Da, što je konzistentno s predviđenom veličinom OprK

deriviranog produkta (tretiranog s CNBr-om). Iz ovih činjenica možemo sugerirati kako je OprK protein zaista produkt ORFC te ćemo ga odsada pisati kao oprK (Poole i sur. 1993).



Slika 3. Prikaz ORFC produkta u vrste *E.coli* K38 stanice *E. coli* sadržavaju pT7-5 (linija 1) te pT7-6 (linija 2) plazmide koji nose ORFC gen. Crveno – produkt mol.mase 51 kDa ; Crno – produkt mol. mase 49 kDa ; Žuto – produkt mol. mase <97 kDa (preuzeto iz rada Poole i sur. 1993.)



Slika 4. Restriksijska mapa ORFABC operona – produkt restriksijskih i sekvencijskih analiza (Poole i sur. 1993)

4.6 Karakterizacija mutanata s defektom u ORFABC operonu

Kako bi pokazali izravni utjecaj ORFABC operona u multiploj rezistenciji na antibiotike konstruirani su mutanti s specifičnim promjenama u ORFABC. Naime, te se promjene očituju u smanjenoj sintezi određenih produkata ovog operona. U svrhu dokazivanja ove tvrdnje konstruirani su mutanti za svaki pojedini gen u operonu (ORFA, ORFB, ORFC). Zanimljiva je činjenica da se mutirani geni nisu mogli uvesti u divlji tip *P.aeruginosa* (PAO1) niti u soj K385, unatoč višestrukim pokušajima. Nasuprot tome, mutirani geni su uspješno uvedeni u roditeljski soj K372, a uspjeh je postignut i kod sojeva poput K590 (mutirani ORFA), K636 (mutirani ORFB) i K613 (mutirani ORFC) (Poole i sur. 1993). Kao što to vidimo iz tablice 4., spomenuti sojevi pokazali su izuzetnu podložnost na veći broj antibiotika kao što su tetraciklin, kloramfenikol, ciprofloksacin te na spojeve koji vežu željezo (streptonigrin i 2,2-dipiridil). Očito je da geni ovog operonskog sustava imaju važnu ulogu u kontroli aktivnosti ovih antibiotika.

Tablica 4. Podložnost ORFABC mutanata na antimikrobialne agense (preuzeto iz rada Poole i sur. 1993.)

Susceptibilities of <i>P. aeruginosa</i> ORFABC mutants to antimicrobial agents					
Strain	MIC ^a of:				
	DIP	SN	CIP	CAM	TET
K372	0.5	10	0.25	12.5	2.5
K590 (ORFA ⁻)	0.25	2.5	0.125	3.125	ND
K613 (ORFC ⁻)	0.25	2.5	0.125	3.125	≤0.15
K635	2	10	0.125	25	5
K636 (ORFB ⁻)	0.5	1.25	0.0625	6.25	0.312

^a See Table 2, footnote a. ND, not determined.

4.7 Homologija produkata ORFABC operona s bakterijskim proteinima uključenim u otpornost na antimikrobiotčke agense

Produkti ORFAB-a imaju veliki postotak homologije (40-60%) s produktima envCD gena za koje se smatralo da sudjeluju u formaciji septuma (pri diobi) u vrste *E.coli*. No, mutanti s defektom u ORFAB kompleksu gena nisu pokazivali promjenu u formaciji septuma stoga nema razloga smatrati da produkti envCD gena igraju ključnu ulogu u tom procesu (Poole i sur. 1993). Daljnim proučavanjem došlo se do identifikacije proteina koji imaju visok postotak homologije s proteinima ORFAB. Proteini pod nazivom AcrA i AcrB odgovaraju prethodnom opisu, a ujedno su i proizvod operona odgovornog za rezistenciju na acriflavin kao i na određeni broj hidrofobnih antibiotika, boja i detergenata u vrste *E.coli*. Utvrđene su sličnosti između ORFA i AcrA genskih produkata (57,7% identiteta) te između produkata ORFB i AcrB gena (69,8% identiteta) (Poole i sur. 1993). Homologni proteini su usporedivih veličina, a primjerice kod ORFA i AcrA genskih produkata možemo vidjeti sličnost u postojanju lipoproteinskog dodatka. Protein FusA (produkt gena odgovoran za rezistenciju na fusarinsku kiselinu) identificiran u vrste *Pseudomonas cepacia* ima određen stupanj homologije s oprK produktom. Iako stupanj homologije proteina navedenih gena nije visok, otkriveno je kako su ogranci identični u 29,4 % , a 12,3% ih pripada konzerviranim supstitucijama (Poole i sur. 1993). Zanimljivo je kako nije pronađena značajna homologija između ORFA-ORFB-ORFC operona i njegovih produkata s već sekvenciranim mar lokusom *E.coli* odgovornim za multiplu rezistenciju na antibiotike.

4.8 Homologija ORFABC produkata i bakterijskih eksportnih proteina

Utvrđeno je kako je multipla rezistencija na antibiotike vrste *E.coli* dijelom posljedica funkcije eksport – komponente (proteina) locirane u citoplazmatskoj membrani. Također je dokazana određena homologija između ORFB genskog produkta i kationskog eksportnog proteina vrste *Alcaligenes eutrophus* pod imenom CzcA (Poole i sur. 1993). Pregledom genske banke uočen je niz proteina homolognih s produktima ORFABC operona (pogledaj tablicu 5).

Tablica 5. Identifikacija proteina koji pokazuju homologiju s ORFABC produktima (preuzeto iz rada Poole i sur. 1993.)

Identification of proteins exhibiting homology to the ORFABC products ^a			
Protein	Size (no. of residues)	Alignment score ^b	Function
ORFA	383		
AcrA	397	50.174	Acriflavine resistance
EnvC	384	32.514	?
LktD	477	5.656	Leukocidin export
CzcB	520	4.625	Heavy metal efflux
HlyD	478	2.789	Hemolysin export
ORFB	1,046		
AcrB	1,049	162.56	Acriflavine resistance
EnvD	964	74.827	?
CzcA	1,063	18.893	Heavy metal efflux
CnrA	1,075	14.135	Heavy metal efflux
NodH	215	48.151 ^c	Nodulation factor export
NodI	454	23.47 ^d	Nodulation factor export
ORFC	477		
NodT	467	32.048	Nodulation factor export
CyaE	474	14.376	Cyclolysin export
PrtF	462	4.505	Protease export
FusA	433	0.272	Fusaric acid resistance

Primjerice, proteini citoplazmatske membrane uključeni u izbacivanje kationa u vrste *A.eutrophus* (CzcB) i hemolizina u vrste *E.coli* (HlyD) dijele homologiju s ORFA proteinom. Osim navedenih, određeni stupanj homologije s ORFA ima protein s funkcijom eksporta leukocidina u vrste *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Sličnu karakteristiku

nalazimo između ORFB produkta i drugog kationskog eksport proteina CnrA. Na kraju, možemo povući istu paralelu s oprK proteinom i nizom eksportnih proteina vanjske membrane pod imenima CyaE (eksport ciklolizina u vrste *Bordetella pertussis*), PrtF (eksport proteaze u vrste *Erwinia chrysanthemi*). Homologija s NodT je osobito zanimljiva jer se *nodT* gen nalazi u klasteru gena uključenih u eksport nodulacijskih faktora pri procesu nodulacije u vrste *Rhizobium leguminosarum*. Vezano uz ovu činjenicu moramo naglasiti kako je ORFB homologan s dva proteina nodulacije kod vrste *Rhizobium meliloti*, NodH i NodI. Za navedene proteine se smatra kako su uključeni u sekreciju nodulacijskih faktora (Poole i sur. 1993).

4.9 Kratka diskusija otkrića ORFABC operona

Iz dosadašnjih podataka možemo uočiti vezu između proizvodnje proteina vanjske membrane (50-kDa, u vrste *P.aeruginosa* soja K385) sa smanjenom podložnošću na 2,2-dipiridil i određen broj antimikrobnih tvari. Da se ne radi samo o već navedenim, spoment ćemo kako sojevi *P.aeruginosa* nfxB i nfxC (otporni na norfloxacina) također pokazuju smanjenu podložnost na nekoliko antimikrobnih agenasa popraćenu sintezom proteina vanjske membrane (54 i 50 kDa). Mutanti (*P.aeruginosa*) otporni na ciprofloxacina sa karakteristikom unakrsne otpornosti na nequinolonske antibiotike pokazali su sličnu produkciju spomenutog proteina mase 54-kDa (Poole i sur. 1993). Unatoč suptilnim razlikama u fenotipu rezistencije kod ovih mutanata, nameće se privlačna hipoteza kako su svi proteini vanjske membrane identificirani u pojedinim slučajevima isti. Ako je to posrijedi, tada smanjena akumulacija antimikrobnih tvari koja vodi ka otpornosti u nfxB i nfxC mutanata ne bi odgovarala promjenjenoj permeabilnosti vanjske membrane već, bi zbog spomenute homologije OprK i drugih eksport proteina odgovarala izbacivanju tih tvari van stanice. Iz te perspektive zanimljivo je spomenuti da se multipla rezistencija na antibiotike kod *E.coli* djelomično pripisuje mehanizmu istjecanja (izbacivanja) tvari. Mapiranjem gena je određena lokacija ORFA-ORFB-oprK operona u 16-20-min regiji PAO kromosoma vrste *P.aeruginosa* (Poole i sur. 1993). Usporedbom lokacije ovih i gena koji kodiraju za proteine sekrecije pioverdina došlo se do zanimljive veze koja sugerira da

ORFA-ORFB-*oprK* operon igra važnu ulogu u tom procesu. Podsjećam da ovaj operon kodira za *OprK* protein ali i za dva proteina od 40 kDa i 108 kDa za koje se smatra da dolaze kao sastavni dio citoplazmatske membrane. Zamjećeno je da *OprK*-producirajući K385 soj (otporan na više antibiotika) ima povećanu produkciju dva proteina citoplazmatske membrane navedenih molekularnih masa, što pak sugerira kako je otpornost na antibiotike u soja K385 povezana s povećanom ekspresijom ORFA-ORFB-*oprK* operona. Gledajući na homologiju ORFAB produkata i proteina citoplazmatske membrane vrlo je vjerojatno da ORFAB produkti igraju ulogu u istjecanju (izbacivanju) antimikrobnih agenasa preko citoplazmatske membrane. Time bi posljedično igrali važnu ulogu u otpornosti na antibiotike. Zbog ovoga je predloženo da se ORFAB preimenuje u *mexAB* (multiple efflux). ORFABC (*mexA-mexB-oprK*) operon je reguliran željezom što potvrđuje činjenica da je *OprK* induciran u uvjetima limitirane količine željeza. Rast bakterije *P.aeruginosa* u prisutnosti helatora željeza, koji smanjuje količinu slobodnog željeza, rezultirao je u indukciji *OprK*. Operon ORFABC (*mexA-mexB-oprK*) je osim željezom koreguliran komponentama mehanizma regulacije pioverdina. Zbog toga je predloženo da ima ulogu u njegovoj sekreciji. Opažena homologija između ORFABC (*mexA-mexB-oprK*) produkata i određenog broja bakterijskih eksportnih proteina konzistentna je s tim prijedlogom. Iako su mnogi antibiotici na koje djeluje ORFABC sistem strukturno različiti, oni ipak dijele neke zajedničke karakteristike kao što su aromatski prsten te vezanje kationa (uključujući željezo). Iz navedenih osobina možemo pretpostaviti kako je izvorni supstrat ORFABC sistema, zaslužnog za otpornost na antibiotike, zapravo pioverdin (koji posjeduje sve te karakteristike). Veliki stupanj homologije između ORFAB produkata te proteina *AcrA* i *AcrB* je dobra indikacija za zajedničku funkciju. *AcrA* i *AcrB* membranski proteini, zaslužni su za prijenos tvari poput acriflavina i nekih drugih antimikrobnih agenasa te posljedičnu rezistenciju na njih. Prema dosadašnjim spoznajama možemo pretpostaviti kako je malo vjerojatno da je acriflavin normalni stanični supstrat za ove proteine. Ako razmotrimo činjenicu da je kao i pioverdin, siderofor enterobaktin (kod vrste *E.coli*) također molekula koja sadržava katehol logično je pretpostaviti hipotezu kako *AcrA* i *AcrB*, izvorno, možda imaju funkciju sekrecije enterobaktina. Homologija između ORFAB produkata i *EnvCD* (koji također djeli visok stupanj homologije s *AcrAB*) sugerira da *E.coli* posjeduje multipli sistem za eksport

enterobaktina. Prema svim ovim podacima možemo zaključiti da je multipla rezistencija u vrste *P.aeruginosa* (ali i kod drugih vrsta/rodova bakterija) velikim dijelom posljedica mutacijskih promjena u operonskom sustavu. Ekspresija pojedinog operonskog sustava određena je uvjetima medija u kojem bakterija raste, a rezultat ekspresije su proteini koji sudjeluju u sistemu eksporta antimikrobnih tvari strukturno sličnih izvornom supstratu. Zbog velikog broja tvari koji dijele određene strukturne sličnosti, bakterije (sojevi pojedinačno) posjeduju otpornost na široki spektar agenasa.

4.10 Protein vanjske membrane (OprM) *Pseudomonas aeruginosa* kodiran oprK komponentom mexA-mexB-oprK operona

Protein vanjske membrane (OprK) prisutan kod soja *P.aeruginosa* s multiplom rezistencijom na antibiotike smatran je produktom trećeg gena operona *mexA-mexB-oprK*. Kako bi se potvrdilo da li je ovaj protein identičan drugom proteinu vanjske membrane, znanom kao OprM, provedeni su pokušaji da se mapiraju mjesta insercije transpozona unutar spomenutog mex operona. Amplifikacijom kromosomske DNA s nekoliko Tn5 insercija koji su imali primer-e specifične za svaki gen mex operona otkriveno je da se u jednom slučaju transpozon ubacio u *mexB*, a u druga dva u *oprK*. Uvođenje kloniranog *mexA-mexB-oprK* operona u mutante obnovilo je ekspresiju multiple rezistencije na antibiotike s pratećom produkcijom OprM proteina (Gotoh i sur. 1995). Ovi podaci indiciraju da je OprM kodiran mex operonom. OprM i OprK nisu imunološki unakrsno reaktivni što bi značilo da postoji značajna razlika između ovih dvaju proteina te da OprK protein vjerojatno nije kodiran mex operonom. Zbog ovoga je ovaj operon preimenovan u *mexA-mexB-oprM*. No, osim ovoga operonskog sustava postoje i drugi koje ćemo također opisati u tekstu koji slijedi.

5. MexCD-OprJ operon

MexCD-OprJ MDR (“multiple drug resistance”) eksportni sistem ne može se detektirati kod stanica divljeg tipa *P. aeruginosa* uzgajanog u laboratorijskim uvjetima. Ekspresija ovog sustava može se opaziti kod nfxB MDR mutantskih sojeva in vitro. Pretpostavlja se kako je to posljedica mutacije nfxB gena koja se događa na njegovom lokusu uzvodno od mexCD-oprJ operona. Isprva identificiran kao uzrok rezistencije na fluoroquinolone, MexCD-OprJ proteinskom sustavu pripisana je uloga rezistencije na više antimikrobnih agenasa uključujući makrolide, kloramfenikol, novobiocin, tetraciklin, trimethoprim i neke β -laktame (Poole 2001). Razlika između ovog i MexAB-OprM sustava je ta što prvi ne može vršiti eksport β -laktama kao što su karbenicilin i aztreonam. Visoka podložnost nfxB soja na navedene tvari je logična kada razmotrimo da je ekspresija MexAB-OprM sustava kod spomenutih mutanata jako smanjena. Kod nfx mutanata također je utvrđena velika podložnost na aminoglikozide koji su supstrat MexXY-OprM MDR sustava. To sugerira da postoji slična regulacija gena kao kod prethodno opisanog slučaja. Normalno, tada bi podložnost na aminoglikozide bila posljedica smanjene ekspresije MexXY-OprM tripartitnog sistema. Opisane su dvije klase nfxB mutanata kod kojih se mogla opaziti umjerena (tip A) i visoka (tip B) razina eksportnih sistema. Utvrđeno je da razina ekspresije gena za spomenute eksportne sisteme korelira s razinom rezistencije. Opažanje zamjetne podložnosti kod izvornih nfxB mutanata na tetraciklin i kloramfenikol (koje je opisano samo za tip B nfxB soja) sugerira da su navedene tvari loši supstrati za ovaj eksportni sistem (Poole 2001). Dakle, možemo zaključiti da je visoki stupanj ekspresije gena ovog sustava nužan za značajan eksport specifičnih tvari i konačno za zamjetnu rezistenciju na te iste spojeve. Malo je poznato o organizaciji MexCD-OprJ MDR eksport sistema osim toga da MexD kao i njegov homolog MexB (iz mexAB-oprM) sadrži 12 transmembranskih uzvojnica. Pokazano je da se OprM može funkcionalno zamjeniti OprJ proteinom (i obratno), a također se taj isti OprM može iskoristiti kako bi zamjenio OprN protein (Poole 2001). Tom zamjenom dobivamo funkcionalnu MexCD-OprM chimera koja potvrđuje činjenicu o znatnoj fleksibilnosti suradnje proteina vanjske membrane i eksportnih proteina unutarnje (citoplazmatske) membrane. Nasuprot tome, unakrsno regrutiranje citoplazmatskih proteinskih konstituenata MexAB-OprM i MexCD-OprJ sustava nije dalo

funkcionalne eksportne sisteme. Ovaj rezultat mogli bi objasniti specifičnom interakcijom MexC i MexD te MexA i MexB.

6. MexEF-OprN operon

Kao i kod prethodnog ekspresija MexEF-OprN sistema nije zamjećena kod stanica divljeg tipa bakterija koji su uzgajani pod laboratorijskim uvjetima. Ekspresija je pak opažena kod soja nfxC kojeg karakterizira multipla rezistencija na antibiotike kao što su fluoroquinoloni, tetraciklin, kloramfenikol. Mutanti nfxC soja pokazuju rezistenciju na fluoroquinolone, kloramfenikol, trimethoprim i imipenem (karbapenem) (Poole 2001). Opažena podložnost (kod ovih mutanata) na β -laktame i aminoglikozide koju dijele s već spomenutim nfxB sojem može biti posljedica smanjene ekspresije MexAB-OprM i MexXY-OprM sustava, čiji su supstrati navedeni spojevi. Rezistencija na imipenem nije rezultat ekspresije MexEF-OprN već pratećeg smanjenja OprD proteina u vanjskoj membrani. Naime, OprD protein služi kao kanal za imipenem te je glavni put ulaza ovog antibiotika kod vrste *P. aeruginosa*. Nedostatak ovog proteina često rezultira stvaranjem sojeva rezistentnih na imipenem (Poole 2001). Priroda mutacije koja vodi do hiperekspresije MexEF-OprN sustava nije još sasvim razjašnjena, ali se zna da je uvjetovana produktom mexT gena koji se nalazi uzvodno od mexEF-oprN operona. MexT pozitivno regulira ekspresiju mexEF-oprN operona te je zaslužan za smanjenje produkcije oprD gena kod promatranog nfxC soja *P.aeruginosa*. Klonirani mexT gen reducira ekspresiju oprD gena što sugerira da djeluje na razini transkripcije oprD, dok MexT djeluje posttranskripcijski osiguravajući smanjenu produkciju OprD proteina (Poole 2001).

7. MexXY-OprM operon

Za razliku od dosadašnjih eksportnih operona koje smo opisali, mexXY sistemu (poznat i kao amrAB) nedostaje povezani gen za protein vanjske membrane. To podsjeća na acrAB MDR eksportni operon vrste *E.coli* čiji je gen (tolC), koji kodira za protein vanjske membrane, također smješten na udaljenom lokusu istog kromosoma (Poole 2001). MexXY očito koristi OprM kao protein vanjske membrane i tako potvrđuje ranije utvrđeno opažanje da može normalno funkcionirati kod MDR (multidrug resistance) sojeva kojima nedostaje MexAB. Podsjetimo se da protein vanjske membrane u eksportnom sustavu ne može funkcionirati kao eksportni sustav bez pridruženih proteina unutarnje membrane. TolC protein *E.coli* također djeluje kao komponenta vanjske membrane i to za nekoliko tripartitinih eksportnih sustava. Sojevi kojima je nedostajao mexXY pokazali su povećanu podložnost na aminoglikozide kao i na tetracikline i eritromicine (Poole 2001). Takav fenotip indicira da ovaj eksportni sistem uvelike pridonosi unutarnjoj rezistenciji *P.aeruginosa* na spomenute agense. Kod divljih sojeva ova je rezistencija ovisna o indukciji MexXY pomoću tih tvari. Hiperekspresija MexXY/AmrAB opažena je u nekoliko aminoglikozid rezistentnih sojeva *P.aeruginosa*. Eliminacijom amrB (mexY) kompromitira se spomenuta otpornost što nedvojbeno potvrđuje ulogu AmrAB/MexXY u toj fenotipskoj karakteristici (rezistencije). Nedavno je zapažen mutant koji pokazuje konstitutivnu ekspresiju MexXY te prateću smanjenu podložnost na fluoroquinolone i aminoglikozide. Ovo nam ukazuje da ovaj eksportni sistem ima ulogu u otpornosti i na fluoroquinolone, a ne samo na aminoglikozide. Nemogućnost razvitka otpornosti na fluoroquinolone kod divljih sojeva objašnjava se činjenicom da te iste tvari kod njih ne induciraju ekspresiju MexXY, za razliku od mutantata. Gen mexZ (ili amrR) identificiran je uzvodno od lokacije mexXY te mu je pripisana uloga kodiranja represor proteina za ekspresiju mexXY/amrAB gena. "Brisanje" (izbacivanje) ovog gena pojačava transkripciju amrAB/mexXY gena čime se kod takvog Δ amrR soja ipak ne razvija očekivano znatna rezistencija na aminoglikozide (Poole 2001). Ovo je vjerojatno posljedica izostanka prateće hiperekspresije gena koji kodira za komponentu (protein) vanjske membrane (oprM). Mogli bi reći da je rezistencija na aminoglikozide ovisna o hiperekspresiji gena koji kodiraju za AmrAB/MexXY te se oslanja na mutacije ovih gena.

8. Zaključak

Karakteristika prirodne multiple rezistencije na antibiotike vrste *P.aeruginosa* svoje postojanje uvelike duguje prisutnosti (funkciji) tripartitnih MDR (multiple drug resistance) eksportnih sistema. Smatralo se kako je multipla rezistencija na antibiotike posljedica promjene u permeabilnosti stanične membrane bakterija, no sada znamo da su navedeni eksportni sistemi uvelike zaslužni za tu pojavu. Prvi puta je ovo statistički utvrđeno na operonskom sustavu, vrste *P.aeruginosa*, *mexA-mexB-oprK*, a nakon toga su pronađeni strukturno i funkcionalno slični sustavi kao što su MexCD-OprJ, MexEF-OprN te MexXY-OprM. Strukturno se podudaraju u činjenici da su to sustavi čija su dva proteina smještena na citoplazmatskoj membrani dok je treći protein dio vanjske membrane. Proteini citoplazmatske membrane obavljaju transport tvari, a protein vanjske membrane je transmembranski kanal koji omogućava prolaz tih istih tvari. Pojedini operonski sustav djeluje na više različitih spojeva čime se postiže multipla rezistencija. Osim toga, kombinacija operonskih sustava dovodi do daljnjeg proširenja aktivnosti na pojedine supstrate. Raznovrsnost navedenih operonskih sustava kod pojedinih sojeva vrste *P.aeruginosa* objašnjava se mutacijom, tj. modifikacijom već postojećih eksportnih sistema s izvorno različitim supstratom. Ono što upućuje na točnost spomenute hipoteze je utvrđena homologija između proteina različitih operonskih sustava. To znači da modificirani operonski sustavi imaju sposobnost vezanja nekih novih supstrata, ali i supstrata koji dijele određene funkcionalne djelove s izvornim supstratom. Iz ovoga se promjena i kombinacija eksportnih operonskih sustava čini kao glavni uzrok višestruke rezistencije na različite antibiotike. Za kraj ostaje činjenica je da će daljnja istraživanja pomoći detaljnije rasvijetliti ovaj fenomen.

9. Sažetak

Multipla rezistencija bakterije *Pseudomonas aeruginosa* predstavlja velik problem stoga što sužava izbor djelotvornih antibiotika, a time povećava mogućnost smrtnog ishoda kod zaražene osobe. Zbog navedenog problema provedena su istraživanja s ciljem otkrivanja uzroka rezistencije kod ove vrste bakterije. Ovaj seminar se osvrće na otkrivanje proteina zaslužnih za izbacivanje antimikrobnih tvari iz stanice i posljedičan razvoj rezistencije. Rad kronološki slijedi razvoj ideja i otkrića pojedinih proteinskih eksportnih sistema zaslužnih za već spomenutu otpornost bakterije.

10. Summary

Multiple resistance of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* presents a big issue because it narrows the choice of efficient antibiotics and enhances the possibility of mortality in infected individuals. As a result of this problem several studies were conducted in purpose of discovering the real cause of the resistance. In this paper I have presented the course of discoveries which include identification of some crucial export proteins. These proteins export various antimicrobial agents. This work follows the development of ideas and discoveries of certain protein export systems responsible for formerly mentioned resistance.

11. Literatura

Nester E. W., Anderson D. G., Roberts Jr. C. E., Pearsall N. N., Nester M. T., Hurley D. (2004): Microbiology, a Human Perspective. McGraw-Hill, New York, p. 507 - 528.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolones>

Meyer J. M., Neely A., Stintzi A., Georges C., Holder I. A. (1996): Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity, 64, 518-523.

Kalenić S., Mlinarić-Missoni E., Aggoli B., Gmajnički B., Perković D., Presečki V., Punda-Polić V., Senji P. (1995): Medicinska bakteriologija i mikrobiologija: *Pseudomonas, Acinetobacter*. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, p. 237 - 242.

Livermore D. (2002): Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. Chicago Journals - Clinical infectious diseases, 34, 634-640.

Gotoh N., Tsujimoto H., Poole K., Yamagishi J. I., Nishino T. (1995): The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. Antimicrobial agents and chemotherapy, 39, 2567-2569.

Masuda N., Gotoh N., Ohya S., Nishino T. (1996): Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 40, 909-913.

Poole K. (2001): Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 3, 255-264.

Poole K., Krebs K., McNally C., Neshat S. (1993): Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. Journal of bacteriology, 175, 7363-7372.